微贮玉米秸秆对道寒杂交断奶羔羊瘤胃发酵及微生物区系的影响

郭云霞[1,2]　郝庆红[2]　刘月琴[1*]　张英杰[1]　任淑月[2]

（1.河北农业大学动物科技学院，保定 071001；2.河北农业大学生命科学学院，保定 071001）

摘　要：本试验旨在研究微贮玉米秸秆对道寒杂交断奶羔羊瘤胃发酵及微生物区系的影响，为微贮玉米秸秆促进营养物质消化吸收研究提供理论依据。试验选用平均体重为（24.62±3.59） kg 的道寒杂交断奶羔羊 80 只，采用单因子完全随机试验设计分为 5 组（每组 16 只），分别饲喂微贮玉米秸秆替代 0（对照）、25%、50%、75%、100%青贮玉米秸秆的全混合日粮（TMR）。预试期 15 d，正试期 60 d。结果表明：在饲喂 4 h 后，瘤胃液 pH 除 25%添加组较对照组稍有下降($P>0.05$)外，50%、75%、100%添加组分别较对照组提高了 1.39%（$P>0.05$）、4.16%（$P<0.05$）、7.45%（$P<0.01$）；随着玉米秸秆微贮添加量的增加，瘤胃液总挥发性脂肪酸的含量呈先上升后降低趋势，25%、50%、75%添加组分别较对照组升高了 0.93%（$P>0.05$）、4.18%（$P>0.05$）、5.19%（$P<0.05$），100%添加组与对照组相近（$P>0.05$）；各添加组瘤胃液乙酸/丙酸均低于对照组，25%、50%、75%、100%添加组分别较对照组下降了 12.44%（$P<0.05$）、4.93%（$P>0.05$）、12.21%（$P<0.05$）、9.86%（$P<0.05$）。DGGE 图谱分析得出，微贮玉米秸秆替代适量青贮玉米秸秆促进了瘤胃液纤维降解菌的增殖，抑制了蛋白质降解菌的增殖。综上可知，以微贮玉米秸秆替代 75%青贮玉米秸秆配制 TMR 更有利于提高道寒杂交断奶羔羊的瘤胃发酵水平。

关键词：微贮玉米秸秆；瘤胃液；挥发性脂肪酸；DGGE

中图分类号：S816

微贮玉米秸秆是利用微生物菌剂对玉米、稻草等农业废弃物进行发酵处理，以期降低秸秆中纤维素、木质素的含量，提高微贮后秸秆的适口性，促进营养物质消化吸收。目前试验证实，经微贮后，秸秆中纤维素、半纤维素和木质素聚合物的酯键发生酶解反应，使其中的木质素[1]和纤维素的含量显著降低，并可提高饲料的消化率，进而促进动物的日增重，降低

收稿日期：2016-07-21
基金项目：国家肉羊现代产业技术体系建设项目（CARS-39）；国家绒毛用羊产业技术体系建项目（CARS-40-21）
作者简介：郭云霞（1978-），女，河北新乐人，高级实验师，博士研究生，从事农业微生物及羊繁殖调控。E-mail： gyx310@163.com
*通信作者：刘月琴，教授，硕士生导师，E-mail： liuyueqin66@126.com

了料重比[2]。饲粮类型、组成、加工方式等在很大程度上影响瘤胃液 pH、瘤胃内微生物区系的平衡[3]，进而影响挥发性脂肪酸（VFA）的生成量，最终影响饲粮的消化吸收利用率。瘤胃的酸度对维持瘤胃内环境相对恒定具有主导作用，瘤胃液 pH 可以综合反映瘤胃微生物状态、VFA 产生、吸收、排出等的情况，而 VFA 是反刍动物瘤胃内消化吸收的重要指标，反刍动物机体所需 75%左右的能量均由 VFA 提供[4]，同时它还能为瘤胃微生物的生长与繁殖提供一个较为理想的酸性环境，利于瘤胃微生物对饲料进行发酵[5]，从而影响瘤胃上皮吸收运转，最终影响动物的采食量[6]。微贮玉米秸秆不仅对秸秆中的木质素、纤维素有降解作用，同时也可以提高发酵后秸秆中粗蛋白质的含量，利用微贮玉米秸秆进行饲粮配制，可提高饲粮中粗饲料的添加比例，降低精饲料的添加比例。本试验通过研究 MFS 对道寒杂交[无角道赛特羊（♂）×小尾寒羊（♀）]断奶羔羊瘤胃发酵及微生物区系的影响，旨在为玉米秸秆微贮促进营养物质消化吸收提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

选取 80 只体况良好、健康的平均体重为（24.62±3.59） kg 的道寒杂交断奶羔羊，采用单因子完全随机试验设计将供试羊随机分成 5 组（表 1），分栏饲养，每组 16 只。预试期为 15 d，期间对试验羊的健康状况进行检查，并编号。正试期为 60 d，每天分别在 08：00 和 16：00 饲喂，自由饮水，定期对羊舍进行清扫及消毒，保证羊舍干燥卫生。

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

项目 Items	粗饲料组成 Roughage composition
对照组 Control	100%青贮玉米秸秆
Ⅰ组 Group Ⅰ	25%微贮玉米秸秆+75%青贮玉米秸秆
Ⅱ组 Group Ⅱ	50%微贮玉米秸秆+50%青贮玉米秸秆
Ⅲ组 Group Ⅲ	75%微贮玉米秸秆+25%青贮玉米秸秆
Ⅳ组 Group Ⅳ	100%微贮玉米秸秆

1.2 微贮玉米秸秆的制作

MFS 制作：添加发酵菌剂（枯草芽孢杆菌 N-8：枯草芽孢杆菌 N-10：酵母菌=4:4:3，活菌数均为 1.0×10^{10} CFU/g，每吨秸秆添加 100 g）和硫酸铵（每吨秸秆添加 3%）混合均匀后厌氧发酵 30 d，启用。试验所用微贮玉米秸秆与青贮玉米秸秆的营养成分见表 2.

表 2　微贮玉米秸秆与青贮玉米秸秆的营养成分（干物质基础）

Table 2　Nutrient components of silage corn straw and microbial fermentation corn straw　（DM basis）　%

项目 Items	青贮玉米秸秆 Silage corn straw	微贮玉米秸秆 Microbial fermented corn straw
粗灰分 Ash	11.59±1.87	12.42±0.27
粗脂肪 EE	3.40±0.58	3.13±0.31
粗蛋白质 CP	7.06±0.22	14.60±0.43
粗纤维 CF	63.70±0.29	50.48±0.20
中性洗涤纤维 NDF	67.07±2.02	27.61±0.99
酸性洗涤纤维 ADF	44.80±1.26	25.84±2.97
无机氮的残留 Inorganic N residues	0.000 0	0.002 5

1.3 试验饲粮配制

参考 NRC（2007）饲养标准制订全混合日粮（TMR）配方（表 3）。随着羊体重的增加，按日增重 200 g 左右进行饲喂量的调整，共 3 期，每期 20 d。第 1 期每天每只羊干物质饲喂量为 1.0 kg，第 2 期和第 3 期逐渐增加到 1.1 kg 左右，以保证羊只生长的需要。

表 3　全混合日粮组成及营养水平（风干基础）

Table 3　Composition and nutrient levels of TMR　（air-dry basis）　%

项目 Items	对照组 Control group	Ⅰ组 Group Ⅰ	Ⅱ组 Group Ⅱ	Ⅲ组 Group Ⅲ	Ⅳ组 Group Ⅳ
原料 Ingredients					
青贮玉米秸秆 Silage corn straw/kg	66.73	49.82	32.75	49.14	
微贮玉米秸秆		17.08	32.75	16.84	64.56

Microbial fermented corn straw					
玉米 Corn	22.24	22.14	23.99	25.00	25.73
小麦麸 Wheat bran	4.65	5.07	5.54	5.01	6.55
豆粕 Soybean meal	5.56	5.07	4.15	3.19	2.34
石粉 Limestone	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
食盐 NaCl	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
多维 Multi-vitamin1)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
矿物微量元素 Mineral trace element1)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels2)					
消化能 DE/(MJ/kg)	14.82	14.66	14.93	14.96	14.67
可消化粗蛋白质 Digestible CP	10.06	10.49	10.09	10.14	10.01
钙 Ca	0.4	0.4	0.4	0.39	0.38
磷 P	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2

1)多维和矿物为每千克饲粮提供 Multi-vitamin and mineral trace elements provide the following per kg of diets: VA 10 260 IU，VE 301 IU，VD 2 200 IU，Fe 57.86 mg，Zn 42.73 mg，Mn 33.65 mg，Cu 9.34 mg，Se 0.19 mg，I 0.76 mg，Co 0.23 mg.

2)营养水平为实测值。Nutrient levels are measured values.

1.4 检测指标

1.4.1 瘤胃液 pH

饲养试验结束当天，对照组、I组、II组、III组、IV组饲喂时间分别为 07:00、10:00、13:00、16:00、19:00，屠宰时间分别为 11:00、14:00、17:00、20:00，屠宰后立即采集瘤胃液。每组选取 5 只进行屠宰，采用 4 层纱布过滤进行瘤胃液的采集，每只采集 10 mL，采集

后立即测定 pH（pHS-3C pH 测定仪）。

1.4.2 瘤胃液细菌计数

将瘤胃液取 5 mL 放入冰盒中，带回实验室后取 1 mL 瘤胃液采用 10 倍梯度稀释法稀释至 10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 3 个稀释度，涂布于营养琼脂（NA）培养基上，9 cm 平板的接种量为 100 μL，每个稀释度至少 3 个平行，37 ℃厌氧恒温培养 48 h，选择菌落数为 30～300 的平板进行计数。

1.4.3 瘤胃液 VFA 含量的测定

将瘤胃液经 4 层纱布过滤，滤液经 7 500 r/min 离心 5 min，过微孔滤膜，参照 Mkhize 等[7]的方法利用气相色谱（Agilent MSD-5975C）-质谱仪（Agilent GC-7890A 型）直接进样分析瘤胃液中 VFA 的含量。采用自动进样器（Agilent 7683B Series），毛细管柱（Agilent HP-INNOWA：30 m×0.250 mm×0.25 μm；火焰离子化（FID）检测器。

色谱条件：载气为氮气（N_2）（144.58 kPa，总流量 24 mL/min）；进样口温度 250 ℃；质谱仪四极杆温度 150 ℃；离子源温度 230 ℃；采用程序升温，初始温度 100 ℃，时间 3 min，以 5 ℃/min 的速率升温至 150 ℃，运行 13 min，再以 30 ℃/min 的速率升温至 210 ℃；进样量为 1 μL。

1.4.4 瘤胃液中菌群丰度的测定

取饲喂 4 h 后的瘤胃液，采用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）手提法提取样品基因组总 DNA。以样品基因组 DNA 为模板，采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R(表 4)扩增样品 16S rDNA 高变区序列，为了在后续的变性梯度凝胶电泳(DGGE)中提高其分辨率，采用 GC 夹技术，即在其上游引物 338F 前加上 GC 重复序列。采用变性梯度为 35%～55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中于 150 V、60 ℃下电泳 5 h。

表 4　引物序列

Table 4　Primer sequences

引物 Primers	序列 Sequences
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG

GC-338F	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCGCGGGGG-CCT ACG GGA GGC AGC AG

采用 T-gradient PCR 仪（Biometra，德国）进行 PCR 扩增，Gel-Doc2000 凝胶成像仪（Bio-Rad，美国）进行成像。

PCR 扩增体系（50 μL）为：10×PCR buffer 5 μL、dNTP（2.5 mmol/L）3.2 μL、rTaq（5 U/μL）0.4 μL、GC-338F（20 μmol/L）1 μL、518R（20 μmol/L）1 μL、模板 DNA 50 ng，补双蒸水（ddH$_2$O）至 50 μL。

PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。

PCR 产物采用 OMEGA 公司的 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。测序结果采用 DNAstar 和 Cluster 软件进行序列分析，下载最相似的菌株序列作为系统发育树的参考序列，然后采用 MEGA5.0 软件利用邻接（neighbor-joining）法构建系统发育树，自展数（bootstrap）为 1 000。

1.5 数据分析与统计

试验数据采用 Excel 2013 软件进行整理，利用 SPSS 17.0 进行统计分析，通过单因素方差分析进行显著性检验，试验结果以平均值±标准差（mean±SD)表示。$P<0.01$ 为差异极显著，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 微贮玉米秸秆对瘤胃发酵的影响

2.1.1 微贮玉米秸秆对瘤胃液 pH 和总菌数的影响

由表 5 可知，添加微贮玉米秸秆后，饲喂 4 h 后的瘤胃液 pH 除I组有所下降外，其他试验组均呈上升趋势，II组、III组、IV组分别较对照组提高了 1.39%（$P>0.05$）、4.16%（$P<0.05$）、7.45%（$P<0.01$），同时IV组还极显著高于Ⅰ组、II组（$P<0.05$），但与III组无显著差异（$P>0.05$）。各微贮玉米秸秆添加组瘤胃液总菌数均高于对照组，其中I组、II组、III组、IV组与对照组相比分别增加了 20.69%（$P<0.01$）、17.24%（$P>0.05$）、34.48%（$P<0.01$）、10.34%（$P>0.05$）。

表 5 微贮玉米秸秆对瘤胃液 pH 和总菌数的影响

Table 5　Effects of microbial fermented corn straw on pH and total bacteria count in ruminal fluid

项目 Items	对照组 Control group	I组 Group Ⅰ	II组 Group Ⅱ	III组 Group Ⅲ	IV组 Group Ⅳ
pH	5.77±0.23^{Aa}	5.62±0.09^{Aa}	5.85±0.29^{Aa}	6.01±0.21^{ABb}	6.20±0.28^{Bb}
总菌数 Total bacteria count/（×10^{7} cfu/mL）	0.58±0.04^{Aa}	0.70±0.06^{Bb}	0.68±0.02^{ABab}	0.78±0.06^{Bc}	0.64±0.11^{ABab}

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著（*P*>0.05），不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），不同大写字母表示差异极显著（*P*<0.01）。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference（*P*>0.05）, while with different small letter superscripts mean significant difference（*P*<0.05）, and with different capital letter superscripts mean significant difference （*P*<0.01）. The same as below.

2.1.2　微贮玉米秸秆对瘤胃液 VFA 含量的影响

由表 6 可知，饲粮中添加不同量的微贮玉米秸秆后瘤胃液乙酸含量有不同程度下降，与对照组相比，I组、II组、III组、IV组分别下降了 10.56%（*P*<0.01）、2.81%（*P*>0.05）、7.83%（*P*<0.01）、15.03%（*P*<0.01）。与对照组相比，I组、II组、III组瘤胃液丙酸含量分别提高了 0.59%（*P*>0.05）、2.01%（*P*>0.05）、4.73%（*P*>0.05），但Ⅳ组则出现极显著降低（*P*<0.01）。饲粮中添加不同量的微贮玉米秸秆后瘤胃液丁酸、异丁酸、戊酸含量表现为显著或极显著升高（*P*<0.05 或 *P*<0.01），已酸含量表现为显著或极显著降低（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。与对照组相比，I组、II组、III组瘤胃液总 VFA 含量分别升高了 0.93%（*P*>0.05）、4.18%（*P*>0.05）、5.19%（*P*<0.05），IV组接近对照组，差异不显著（*P*>0.05）。与对照组相比，第I组、II组、III组瘤胃液乙酸/丙酸分别下降了 12.44%（*P*<0.05）、4.93%（*P*>0.05）、12.21%（*P*<0.05）、9.86%（*P*<0.05）。

表 6　微贮玉米秸秆对瘤胃液 VFA 含量的影响

Table 6　Effects of microbial fermented corn straw on VFA contents in ruminal fluid　mmol/L

项目 Items	对照组 Control group	Ⅰ组 Group Ⅰ	Ⅱ组 Group Ⅱ	Ⅲ组 Group Ⅲ	Ⅳ组 Group Ⅳ

乙酸 Acetate	36.00±0.64^Aa	32.20±0.56^Bb	34.99±0.41^Aa	33.18±0.11^Bb	30.59±0.94^Bc
丙酸 Propionate	8.46±0.07^Aa	8.51±0.19^Aa	8.63±0.12^Aa	8.86±0.11^Aa	7.87±0.40^Bb
丁酸 Butyrate	9.70±0.14^Bb	15.49±0.33^Aa	15.34±0.06^Aa	15.18±0.07^Aa	14.18±0.54^Aa
异丁酸 Isobutyrate	0.99±0.03^Aa	1.84±0.05^Cd	1.44±0.02^Bb	1.60±0.03^Bc	1.66±0.07^Bc
戊酸 Valerate	2.75±0.05^Aa	2.96±0.07^Bb	3.04±0.06^Bb	3.38±0.08^Cc	2.70±0.15^Aa
已酸 Caproicrate	5.69±0.24^Aa	3.13±0.03^Bc	3.15±0.06^Bc	3.71±0.20^Bc	4.20±0.15^ABbc
总挥发性脂肪酸 TVFA	62.66±0.28^a	63.24±0.61^a	65.28±0.21^a	65.91±0.11^b	62.70±0.13^a
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	4.26±0.13^a	3.73±0.07^b	4.05±0.18^a	3.74±0.13^b	3.84±0.26^b

2.2 微贮玉米秸秆对瘤胃微生物区系的影响

2.2.1 瘤胃液中菌群的聚类分析

DGGE 图谱中所有样品均产生了清晰、丰富的条带，说明瘤胃液中微生物的菌种丰度均较高，同时也可看到不同组别的条带在数目和颜色深浅上有所差异，说明不同组瘤胃液中细菌种类和数量存在差异。DGGE 图谱聚类分析表明，玉米秸秆微贮可以影响瘤胃的微生物区系。由图 1 可知，5 组样品聚成 2 个大簇，其中对照组、Ⅰ组、Ⅱ组聚为一簇，Ⅲ组、Ⅳ组聚为一簇。由戴斯系数比较 PCR-DGGE 图谱的相似性可知，Ⅰ组、Ⅱ组之间的相似值大于 0.61，说明这 2 个组之间瘤胃菌群的相似性较高；Ⅲ组与除对照组外的其他组之间的相似值均小于 0.40，表明此组与其他 3 组的相似性较低。由此可见，随着玉米秸秆微贮添加量的增加，瘤胃内菌群的相似性逐渐降低。

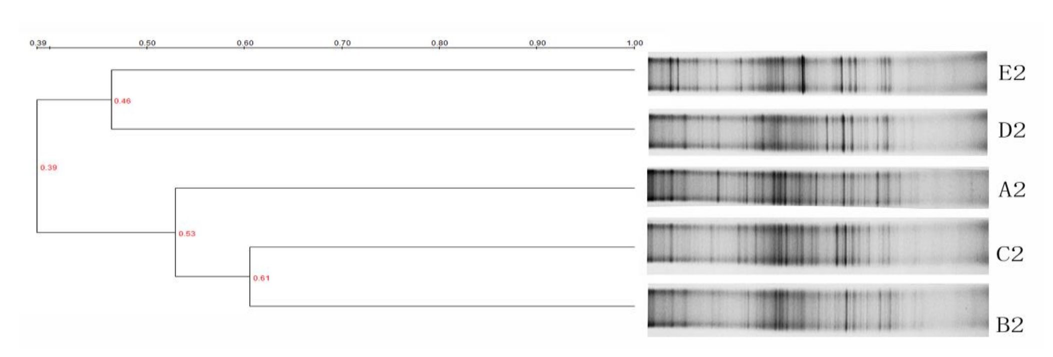


图 1 各组瘤胃液中菌群的聚类分析

Fig.1　Cluster analysis of microflora in ruminal fluid among groups

A2、B2、C2、D2、E2 分别代表对照组、I组、II组、III组、IV组。图 2 同。

A2, B2, C2, D2 and E2 were control group, groupI, group II, group III and group IV, respectively. The same as Fig.2.

2.2.2 主要电泳条带的序列测定及分析

按不同组中条带亮度的不同，选取 15 条 DGGE 凝胶条带（图 2 中标注的 15 条条带）回收后，以 GC-338F 和 518R 为引物进行 PCR 扩增，获得目的 DNA 片段。PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆测序。测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，得到条带所代表的细菌类型。每个回收条带选取 3 个克隆进行序列测定，序列比对分析结果见表 7。结果表明，切胶回收条带所代表的细菌与现有数据库中的细菌有很高的同源性，大部分在 90%以上，有的同源性甚至达到了 100%。

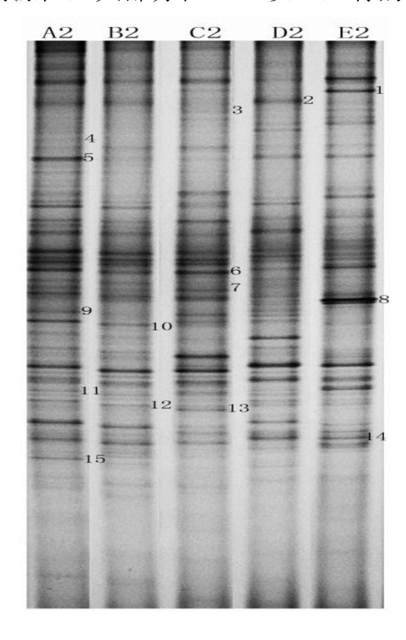


图 2　DGGE 电泳图

Fig.2　Electrophoretogram of DGGE

表 7　序列比对分析结果

Table 7　Results of sequence variation analysis

条带编号	最相似菌株 The most similar strains	登录号 Accession number	相似度 Similar	最相似类群 The most similar groups

Band number			ity/%	
1	*Diploplastron affine*	JN116225	99	原虫
2	瘤胃细菌	AF544208	98	拟杆菌门
3	瘤胃普氏菌	AB849446	97	拟杆菌门
4	瘤胃普氏菌	AF218619	98	拟杆菌门
5	不可培养瘤胃细菌	HQ160761	99	环境样品
6	不可培养拟杆菌	HM105406	99	拟杆菌门
7	拟杆菌	NR_113102	98	拟杆菌门
8	*Polyplastron* sp.	JN116200	99	原虫
9	不可培养细菌	JF661825	99	环境样品
10	*Dongia mobilis*	NR_116676	90	变形菌门
11	不可培养瘤胃细菌	GQ327401	99	环境样品
12	瘤胃细菌	GU324360	99	细菌
13	捻转血矛线虫	LM602445	99	后生动物
14	反刍月形单胞菌	DQ186901	99	壁厚菌门
15	不可培养毛螺旋菌	GQ358423	98	壁厚菌门

由序列比对分析结果可知，条带 1 和 8 已鉴定与原虫相似性为 99%。由 DGGE 图谱可知，随着微贮玉米秸秆添加量的增加，条带 1 和 8 的亮度先逐渐减弱后增强，均在添加量为 100%时最亮；图谱上条带 2、6、7 已鉴定与拟杆菌门中的拟杆菌相似性在 90%以上，在III组中条带 6、7 亮度有增强的趋势；条带 3、4 与瘤胃普氏菌相似性为 98%，是瘤胃中重要的纤维降解菌，随着玉米微贮秸秆添加量的增加，条带亮度逐渐增强；条带 5、9、11 已鉴定与不可培养瘤胃细菌类群相似，相似性达到 99%，鉴定为不可培养瘤胃菌群，随着玉米微贮秸秆添加量的增加，条带 5 的亮度在III组、Ⅳ组高于其他组，而条带 9、11 的亮度则是逐渐增强；条带 10 已鉴定为与变形杆菌门中的变形菌门类群的相似度为 90%，随着玉米微贮秸秆添加量的增加，其亮度逐渐减弱；条带 14、15 与厚壁菌门类群的相似度分别为 99%和 98%，鉴定为反刍月形单胞菌，随着玉米微贮秸秆添加量的增加，其亮度逐渐增强；条

带 15 鉴定为不可培养毛螺旋菌，随着玉米微贮秸秆添加量的增加，其亮度呈下降趋势，以对照组最亮。

采用 MEGA5 软件，邻接法构建系统发育树（图 3），自展数为 1 000，其中条带 1 和 8 的相似类群属于原虫，不参加构建系统发育树。



图 3　系统发育树

Fig.3　Phylogenetic tree

3 讨　论

瘤胃发酵水平直接影响营养物质的利用率。瘤胃内环境的稳定主要体现在瘤胃液 pH 上，而 pH 的变动与饲粮的类型和采食后的时间密切相关[3]。当粗饲料占饲粮比例由 2/3 降低至 1/4 时，瘤胃液 pH 在饲喂 4 h 后由 6.2 下降至 5.9，这可能是精料含量过多，瘤胃微生物快速降解碳水化合物，导致 pH 降低[8]；反之，饲粮中粗纤维的含量越高，瘤胃液 pH 越高，高的 pH 利于瘤胃纤维素降解菌的增殖。据报道，纤维素分解菌（如琥珀酸生成菌、白瘤胃球菌、黄瘤胃球菌等）对酸的耐受性较差，其最适 pH 为 6.0～7.0，当瘤胃液 pH 下降至 6.0 时则抑制纤维素菌的生长[9-10]。本试验结果表明，在精粗比为 1：2 的条件下，通过添加微贮玉米秸秆配制 TMR，在饲喂 4 h 后，随着微贮玉米秸秆添加量的增加，瘤胃液 pH 先下降后逐渐上升，其中添加 75%和 100%微贮玉米秸秆的组的瘤胃液 pH 分别为 6.01 和 6.20，与对照组相比分别提高了 4.16%和 7.45%，差异显著或极显著。这可能是由于微贮玉米秸秆中

含有可降解秸秆中纤维素和木质素的芽孢菌（枯草芽孢杆菌和酵母菌活菌），饲喂 4 h 后，瘤胃微生物发酵产生 VFA，导致瘤胃液 pH 降低，但是随着微贮玉米秸秆添加量的增加，瘤胃液 pH 有明显的升高，表明适量微贮玉米秸秆的添加有助于提高瘤胃的发酵水平，且微贮玉米秸秆中含有数量很高的活性芽孢菌，可短时间提高瘤胃内降解纤维素菌的数量，这与冯伟业[11]的报道一致。

纤维素菌数量增多，饲粮在瘤胃内发酵产生的 VFA 含量增加，表明微生物发酵能力增强。VFA 是瘤胃中碳水化合物发酵的主要产物，主要包含乙酸、丙酸、丁酸等。乙酸主要用于氧化供能，丙酸则被肝脏转变为体组织成分，用于生长、繁殖，另外丙酸产量与甲烷的产生量之间呈负相关，因此，丙酸含量上升可以减少生成甲烷的能量损失[12]。VFA 含量的变化与饲粮中粗饲料比例密切相关。当饲粮中粗饲料比例由 30%提高至 50%时，总 VFA 合成量增加，其中乙酸和丁酸产量下降，丙酸产量则上升[13-15]。从由不同精粗比（3:7、4:6、5:5）试验中得知，在饲喂 0～4 h 阶段，随着粗饲料比例的增加，乙酸含量呈下降趋势，而丙酸浓度呈上升趋势[16]。本试验采集饲喂 4 h 后的瘤胃液，随着微贮玉米秸秆添加量的增加，乙酸含量下降趋势增大，丙酸含量升高趋势降低，与对照组相比，添加 75%微贮玉米秸秆的组瘤胃液乙酸含量降低了 7.83%，丙酸含量增加了 4.73%，总 VFA 含量增加了 5.19%，乙酸/丙酸降低了 12.21%，促进了营养物质的消化吸收。

瘤胃发酵水平的调节最终依靠的是瘤胃内强大的菌群，瘤胃内的细菌可帮助反刍动物消化纤维素和合成大量菌体蛋白。其中纤维的分解主要依靠真菌的强穿透能力和细菌的发酵特性，使植物纤维组织的内部张力先降低、组织变得疏松，细菌再进一步降解发酵[17]。粗饲料显著影响瘤胃微生物区系，粗饲料比例的升高可显著促进瘤胃内蛋白降解细菌、纤维素降解菌、乳酸菌等的增殖，降低瘤胃原虫的数量[18]。参照文献[19]，本试验利用 DGGE 技术对瘤胃液中菌群丰度进行了测定，试验所得 DGGE 图谱中各组样品均产生了清晰、丰富的条带，说明瘤胃液中各菌种丰度都较高，同时不同组间瘤胃液中细菌的种类和数量存在差异。由本试验结果可知，由于原虫为低等生物，用细菌引物也能扩增出来，瘤胃原虫对于细菌的吞食可导致氮在瘤胃中的无效循环，而原虫与甲烷菌关系密切，原虫数量降低促进甲烷菌的增殖[20]，进而降低能量的损耗，降低瘤胃原虫数量可促进营养物质的消化吸收利用率。随着微贮玉米秸秆添加量的增加，原虫数量先出现下降的趋势，以微贮玉米秸秆添加量为 75%

时条带亮度最低，但是在添加量为100%时原虫数量又出现增加，表明用微贮秸秆完全替代青贮玉米秸秆不利于瘤胃的发酵。瘤胃普氏菌是瘤胃重要的木质素降解菌，属拟杆菌门，其在进化树上形成了很大的簇，随着微贮玉米秸秆添加量的增加，瘤胃内瘤胃普氏菌和拟杆菌数量增加，表明木质素降解能力增强。此外，厚壁菌门类群中的反刍月行单胞菌是瘤胃内一种主要的乳酸发酵菌，占瘤胃细菌总数的 50%以上，可对瘤胃内淀粉进行分解，微贮玉米秸秆添加量为75%和100%时瘤胃液中反刍月行单胞菌数量增多，可加快瘤胃内淀粉的降解。随着微贮玉米秸秆添加量的增加，DGGE 图谱中变形菌门和不可培养毛螺旋菌条带的亮度逐渐降低，表明在饲喂 4 h 后蛋白质的降解速度减慢。由此可以看出，微贮玉米秸秆替代适量青贮玉米秸秆影响了瘤胃微生物区系，可促进木质素和纤维素、淀粉降解菌的增殖，降低蛋白质降解菌的增殖，加快碳水化合物的降解，促进营养物质的消化吸收。

4 结　论

① 以微贮玉米秸秆替代 75%青贮玉米秸秆配制 TMR，在饲喂 4 h 后道寒杂交断奶羔羊瘤胃液 pH 即可达到 6.01，利于瘤胃液纤维降解菌的增殖，同时降低蛋白质降解菌的数量。

② 以微贮玉米秸秆替代 75%青贮玉米秸秆配制 TMR 饲喂道寒杂交断奶羔羊，可促进瘤胃内总 VFA 的合成，利于营养物质的消化吸收。

参考文献：

[1] 李红亚,李术娜,王树香,等.产芽孢木质素降解菌 MN-8 的筛选及其对木质素的降解[J].中国农业科学,2014,47(2):324–333.

[2] 韩颖洁.微生物发酵秸秆对肉羊生产性能和营养物质表观消化率的影响[D].硕士学位论文.保定:河北农业大学,2015.

[3] 刘洁,刁其玉,赵一广,等.饲粮不同 NFC/NDF 对肉用绵羊瘤胃 pH、氨态氮和挥发性脂肪酸的影响[J].动物营养学报,2012,24(6):1069–1077.

[4] BANNINK A,FRANCE J,LOPEZ S,et al.Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall[J].Animal Feed Science and Technology,2008,143(1/2/3/4):3–26.

[5] 经语佳,高健,郑亚洲,等.6 种长链脂肪酸对瘤胃微生物体外发酵挥发性脂肪酸浓度的影响

[J].动物营养学报,2014,26(1):252–259.

[6] PENNER G B,TANIGUCHI M,GUAN L L,et al.Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue[J].Journal of Dairy Science,2009,92(6):2767–2781.

[7] MKHIZE N T,MSAGATI T A M,MANABA B B,et al.Determination of volatile fatty acids in wastewater by solvent extraction and gas chromatography[J].Physics and Chemistry of the Earth,2014,67/68/69:86–92.

[8] FERNANDO S C,PURVIS II H T,NAJAR F Z,et al.Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet[J].Applied and Environmental Microbiology,2010,76(22):7482–7490.

[9] STEWART C S.Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents[J].Applied and Environmental Microbiology,1977,33(3):497–502.

[10] 刘欢,李德允.不同水分 TMR 对绵羊瘤胃纤维分解酶活力与微生物生态的影响[J].延边大学农学学报,2013,35(2):160–164.

[11] 冯伟业.不同品质粗饲料日粮及添加酵母培养物对绵羊瘤胃内主要纤维分解菌及纤维物质降解的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特：内蒙古农业大学,2008.

[12] KLIEVE A V,OUWERKERK D.Comparative greenhouse gas emissions from herbivores[C]//Proceedings of the 7th International Symposium on the Nutrition of Herbivores.*Beijing*:China Agricultural University Press,2007.

[13] 华金玲,郭亮,王立克,等.不同精粗比日粮对黄淮白山羊瘤胃挥发性脂肪酸影响[J].东北农业大学学报,2013,44(6):58–62.

[14] 熊本海,卢德勋,张子仪.瘤胃乙酸与丙酸摩尔比例的改变对瘤胃发酵及血液指标的影响[J].畜牧兽医学报,2002,33(6):537–543.

[15] WANAPAT M,GUNUN P,ANANTASOOK N,et al.Changes of rumen pH,fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers[J].The Journal of Agricultural Science,2014,152(4):675–685.

[16] 华金玲,郭亮,王立克,等.不同精粗比日粮对黄淮白山羊瘤胃内环境的影响[J].中国兽医学

报,2013,33(6):913–917.

[17] 王秋菊,胡海权,崔一喆.反刍动物瘤胃生理及代谢调控[J].饲料博览,2006(11):44–46.

[18] HUNG L V,WANAPAT M,CHERDTHONG A.Effects of Leucaena leaf pellet on bacterial diversity and microbial protein synthesis in swamp buffalo fed on rice straw[J].Livestock Science,2013,151(2/3):188–197.

[19] KOCHERGINSKAYA S A,AMINOV R I,WHITE B A.Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis,random sequencing,and statistical ecology approaches[J].Anaerobe,2001,7(3):119–134.

[20] DOHME F,MACHMÜLLER A,ESTERMANN B L,et al.The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil[J].Letters in Applied Microbiology,1999,29(3):187–192.

Effects of Microbial Fermentation Corn Straw on Rumen Fermentation and Microbial Diversity of Dorset×Thin-Hailed *Han* Weaned Lambs

GUO Yunxia[1,2]　HAO Qinghong[2]　LIU Yueqin[1*]　ZHANG Yingjie[1]　REN Shuyue[2]

(1. *College of Animal Science and Technology*, *Hebei Agricultural University*, *Baoding* 071001, *China*; 2. *College of Life Science*, *Hebei Agricultural University*, *Baoding* 071001, *China*)

Abstract: This study was to evaluate the effects of microbial fermented corn straw on microbial diversity of Dorset×thin-hailed *Han* weaned lambs, and to provide theoretical basis for studies on the microbial fermented corn straw promoting the digestion and absorption of nutrients. Eighty Dorset×thin-hailed *Han* weaned lambs with the average body weight of (24.62±3.59) kg were randomly assigned to 5 groups and each group had 16 lambs, in which 0 (control), 25%, 50%, 75% and 100% silage corn straw were substituted by microbial fermented corn straw, respectively. Preliminary trial period was 15 days and formal experimental period was 60 days. The results showed as follows: after feeding 4 h, except the 25% addition group decreased a little (P>0.05), the pH of ruminal fluid in 50%, 75% and 100% addition groups increased by 1.39% (P>0.05),

*Corresponding author, professor, E-mail： liuyueqin66@126.com　(责任编辑　菅景颖)

4.16% ($P<0.05$) and 7.45% ($P<0.01$) compared with the control group, respectively; with the microbial fermented corn straw addition increasing, the total volatile fatty acid (VFA) content in ruminal fluid was firstly increased and then down, which in 25%, 50% and 75% addition groups increased by 0.93% ($P>0.05$), 4.18% ($P>0.05$) and 5.19% ($P<0.05$) compared with the control group, respectively, but it showed no significant difference between in control group and 100% addition group ($P>0.05$); The acetate/propionate in ruminal fluid in addition groups was lower than that in control group, and that in 25%, 50%, 75% and 100% groups decreased by 12.44% ($P<0.05$), 4.93% ($P>0.05$), 12.21% ($P<0.05$) and 9.86% ($P<0.05$) compared with the control group, respectively. By the analysis results of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), using microbial fermented corn straw to substitute appropriate silage corn straw could improve the proliferation of fiber degradation bacterium and inhibite the proliferation of protein degradation bacterium in ruminal fluid. In conclusion, using microbial fermented corn straw to substitute 75% silage corn straw in TMR is optimum to improve the level of ruminal fermentation of Dorset×thin-hailed *Han* weaned lambs.

Key words: microbial fermented corn straw; ruminal fluid; volatile fatty acids; DGGE